

参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 ERK、p38 MAPK 蛋白表达的影响*

李姿慧¹, 王 键^{1△}, 蔡荣林², 孙 娟¹, 叶铭刚¹

(1. 安徽中医药大学中医临床学院, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医药大学针灸经络研究所, 安徽合肥 230038)

摘要: 目的 探讨脾虚湿困型溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)大鼠结肠组织中 ERK、p38MAPK 蛋白表达的变化及参苓白术散的干预作用。方法 40 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、柳氮磺吡啶组、参苓白术散组, 每组 10 只。采用环境与饮食干预结合 TNBS/乙醇灌肠法复制脾虚湿困型 UC 大鼠模型, 应用免疫组织化学法检测各组大鼠结肠组织中 ERK、p38MAPK 蛋白表达情况。结果 模型对照组大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 表达明显增多, 与正常对照组比较具有显著性差异 ($P<0.05$)。柳氮磺吡啶组和参苓白术散组大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 的表达与模型对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。参苓白术散组大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 的表达与柳氮磺吡啶组比较差异亦有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 表达明显增强, 参苓白术散治疗可显著降低其 ERK、p38MAPK 的表达水平。

关键词: 脾虚湿困证; 参苓白术散; ERK; p38MAPK; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)06-0007-04

目前, 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated protein kinases, ERK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK) 是 MAPK 信号通路中研究较为成熟的两个位点蛋白。现认为, MAPK 信号通路与炎症反应的调控密切相关, 近年来其在溃疡性结肠炎的研究中的重要意义日益引起医学界的广泛关注^[1-3]。本实验采用免疫组织化学法测定 ERK、p38MAPK 蛋白在脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织中的表达情况, 并探讨参苓白术散对脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织中 ERK、p38 MAPK 蛋白表达的影响, 以进一步明确 MAPK 信号通路在脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织中的变化及参苓白术散的干预作用, 为揭示湿病和相应化湿法的生物学机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 (200±20)g (南京医科大学实验动物中心提供, 合

格证号: SCXK(苏)20080004)。将大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、柳氮磺吡啶组、参苓白术散组, 每组 10 只。动物房温度保持 18~25℃, 大鼠适应性常规喂养 3d。

1.2 药品与试剂

参苓白术散水煎液组方为: 人参 15g, 茯苓 15g, 薏苡仁 9g, 白术 15g, 桔梗 6g, 莲子肉 9g, 缩砂仁 6g, 陈皮 9g, 甘草 (炒) 9g, 白扁豆 (姜汁浸, 去皮) 12g, 山药 15g; 均购自安徽中医药大学门诊部, 由安徽中医药大学中药制剂室提供制剂; 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS, 由 Sigma 公司生产)、Rabbit Anti-AQP4(H-80): ZS-20812、柳氮磺吡啶肠溶片 (批号 20101212, 上海中西三维药业有限公司)、通用型二抗试剂盒 (PV-6000)、Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 货号: 15596-026)、引物及探针合成 (Invitrogen 公司)、Taq DNA 聚合酶 (Fermentas 公司, 美国)、DAB (北京中杉金桥生物技术有限公司, ZLI-9032)、荧光定量试剂 (TaKaRa 公司)、逆转录试剂盒 (Re-

* 基金项目: 国家自然科学基金 (NO: 81173172, 81302901), 安徽省自然科学基金 (NO: 1308085QH155), 安徽省高等学校自然科学研究重点项目 (NO: KJ2011A184)

收稿日期: 2013-10-31 修回日期: 2013-11-21

作者简介: 李姿慧 (1982~), 女, 山东潍坊人, 讲师, 主要从事中医治则治法的理论与实验研究。

通信作者: 王键, E-mail: wangjian_6301@163.com

vertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas 公司, 货号: 00064525)。

1.3 实验仪器

101-A 恒温干燥箱 (宁波自动化仪表厂)、FA2004 型电子天平 (上海天平仪器厂生产)、OLYMPUS BX51 荧光显微镜 (日本 OLYMPUS 光学工业株式会社)、GSM 凝胶图像分析管理系统 (美国 Sim 公司, Bio-pro CN-UV 型)、TB-718 自动包埋机 (泰维电子设备有限公司)、DP801 形态学显微图像分析系统 (捷达科技发展有限公司)、LEICA ASP200 自动切片机 (LEICA 公司)、PCR 仪 (美国 ABI 公司, ABI2720)、荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司 ABI7500)。

1.4 模型复制方法

采用环境与饮食干预结合 TNBS/乙醇灌肠法复制脾虚湿困型 UC 大鼠模型^[4], 每日 8:00 至 16:00 将大鼠置于 2cm 深的水中, 控制睡眠 8h, 单日禁食, 并给予 4℃生理盐水 (2mL) 灌胃 1 次, 双日给予充足饲料和猪油 (4mL) 灌胃 1 次, 连续 20d。第 21 天, 脾虚湿困型 UC 组大鼠 24h 禁食不禁水, 用 10% 水合氯醛 (3mL/kg) 麻醉, 经肛门将 5% 的 TNBS 与 50% 乙醇混合物 (比例 12:5, 其中 TNBS 120mg/kg) 0.8mL 注入距肛门上段约 8cm 处, 然后将大鼠头部向下持续倒置 1min, 使溶液充分渗入大鼠肠腔内, 再将大鼠头部倾斜放置至自然清醒, 自由饮食。2~4d 后出现黏液血便表明 UC 模型复制成功。根据脾虚湿困证的临床表现, 参照相关文献^[4]拟定大鼠脾虚湿困动物模型宏观体征诊断标准如下: ①倦怠、懒动、蜷缩聚堆; ②小便量减少, 大便软或溏, 浮便率升高, 拉尾排便试验呈阳性, 排便时可出现肛门红肿, 甚至脱肛; ③神态萎靡、毛色枯槁、疏散、竖立, 易脱毛; ④行动缓慢, 甚至行走歪斜; ⑤体质量不增或增加缓慢明显不及正常组甚或降低; ⑥胃肠胀气明显; ⑦饮食减少。其中①~④项为主证, ⑤~⑦项为兼证, 出现上述症状中 3 项主症或 2 项主症加 2 项兼症即可认为脾虚湿困证模型成功。

1.5 实验方法

正常对照组大鼠给予常规喂养, 生理盐水 2mL/只灌胃每日 1 次, 并参照造模方法予肛门灌肠生理盐水 0.8mL/只。模型复制成功后, 参苓白术散组予参苓白术散煎剂灌胃, 根据“不同动物等效剂量折算系数表”^[5]折算出参苓白术散煎剂给大鼠用量

为 12g/(kg·d), 柳氮磺吡啶组灌胃给予 SASP 0.5g/(kg·d), 正常对照组和模型对照组给予 0.9% 生理盐水 10mL/(kg·d) 灌胃, 连续 14d。实验结束后, 将大鼠用 10% 水合氯醛 (3mL/kg) 麻醉, 开腹, 暴露结肠, 从肛门向上纵向剪开大鼠结肠组织, 取病变最明显处 (约肛门上 8cm) 的肠组织约 1cm×1cm, 用生理盐水冲洗干净, 置于 10% 多聚甲醛溶液中固定备用。

1.6 观察指标

免疫组织化学法测定 MAPK 通路中 ERK, P38 磷酸化的蛋白表达, 其中一抗 ERK (SC-94) 浓度 1:100, p38 (ZS-7149) 浓度 1:100。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行处理, 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间均数的两两比较采用最小显著 (LSD) 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠组织 ERK 蛋白的表达

结果可见, 结肠组织中 ERK 的阳性细胞多为棕黄色或褐色表达于细胞核, 部分呈棕黄色或褐色细小颗粒见于细胞浆。模型对照组大鼠结肠组织 ERK 表达较正常对照组明显增多, 其间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。柳氮磺吡啶组和参苓白术散组大鼠结肠组织 ERK 的表达与模型对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$), 同时参苓白术散组大鼠 ERK 的表达与柳氮磺吡啶组比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织 ERK 表达明显增强, 参苓白术散治疗可显著降低其 ERK 的表达水平。详见表 1。

表 1 各组大鼠结肠组织 ERK 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	阳性细胞数	平均光密度
正常对照组	21.34±3.15	0.102±0.019
模型对照组	62.75±8.34 ^{▲▲}	0.195±0.024 ^{▲▲}
柳氮磺吡啶组	29.54±3.87 ^{△△□}	0.147±0.020 ^{△△□}
参苓白术散组	24.07±2.59 ^{△△}	0.124±0.018 ^{△△}

注: [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ 与正常对照组比较; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 与模型对照组比较, [□] $P < 0.05$, ^{□□} $P < 0.01$ 与参苓白术散组比较 (下同)

2.2 各组大鼠结肠组织 p38MAPK 的蛋白表达

正常大鼠结肠组织中的 p38MAPK 表达仅呈弱阳性。模型对照组大鼠结肠组织中 p38MAPK 的阳

性细胞表达显著增多,可见胞核或胞浆中有不均匀的棕黄色颗粒状物。而参苓白术散组大鼠肠上皮细胞染色变淡,有少量 p38MAPK 的阳性细胞表达。检测结果显示,模型对照组大鼠结肠组织 p38MAPK 阳性细胞数和平均光密度显著高于正常对照组($P<0.05$),经治疗后,柳氮磺嘧啶组和参苓白术散组大鼠结肠组织 p38MAPK 表达均较模型对照组显著降低($P<0.05$)。同时参苓白术散组大鼠 p38MAPK 的阳性细胞数和平均光密度与柳氮磺嘧啶组比较差异亦有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织 p38MAPK 表达明显增强,参苓白术散治疗可显著降低其表达水平。详见表 2。

表 2 各组大鼠结肠组织 p38MAPK 表达比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	阳性细胞数	平均光密度
正常对照组	23.57 $\pm$ 3.89 $\Delta\Delta$	0.092 $\pm$ 0.012 $\Delta\Delta$
模型对照组	82.64 $\pm$ 6.45 $\Delta\Delta$	0.153 $\pm$ 0.021 $\Delta\Delta$
柳氮磺嘧啶组	41.21 $\pm$ 3.85 $\Delta\Delta\Box$	0.138 $\pm$ 0.014 $\Delta\Delta\Box$
参苓白术散组	31.68 $\pm$ 7.57 $\Delta\Delta$	0.103 $\pm$ 0.018 $\Delta\Delta$

3 讨论

溃疡性结肠炎是一种病因和发病机制尚未明确的慢性肠道疾病,属于炎症性肠病范畴,具有反复发作的特点,目前认为其发病主要与感染、遗传、免疫、环境和精神等多种因素密切相关^[6]。中医学认为,UC 多属“肠癖”、“肠风”、“泄泻”或“便血”等范畴。有多篇调查研究显示,脾虚湿困证是临床上 UC 的常见证候^[7-8]。近年来,炎症因子和免疫机制的紊乱已作为研究 UC 的热点领域被广泛关注,与炎症反应调控密切相关的 MAPK 信号通路在脾虚湿困型 UC 中的变化及其可能机制值得进一步深入探讨^[9]。

目前,临床上对 UC 的治疗多采用以糖皮质激素和 5-氨基水杨酸类药物为主,但是这两类药物不仅疗效不尽如人意,而且有一定的毒副作用,在很大程度上影响了其临床应用和推广。因此,筛选临床疗效确切且副作用小的药物已成为目前 UC 治疗过程中亟待解决的问题。已有多项研究证实,参苓白术散辨证加减治疗慢性溃疡性结肠炎有较好的疗效^[10],能明显修复胃肠黏膜屏障、改善胃肠动力的作用^[11-12]。我们还在前期研究中发现,参苓白术散可以有效改善脾虚湿困型 UC 大鼠血清和结肠组织超氧化物歧化酶、丙二醛、血清表皮生长因子水平,从

而促进肠粘膜的修复^[13-14]。

现代研究已证实,MAPK 信号通路可以调节体内众多细胞因子的表达,近年来人们已经逐步认识到其在 UC 发病过程中的重要作用。研究发现,p38MAPK 在 UC 结肠组织中的表达与激活均有明显增加,可能是其通过调节 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 等细胞因子的表达参与了 UC 的发生^[15]。痛泻要方可显著提高 TNBS/乙醇法复制的 UC 大鼠结肠组织中 pERK1/2、pMEK1/2 mRNA 的表达,MEK/ERK 信号通路可能参与了痛泻要方修复 UC 模型大鼠肠道损伤的过程^[16]。可见,通过干预 MAPK 信号通路的调控,从而抑制结肠上皮细胞凋亡,促进受损结肠上皮再生与修复,对于保护结肠粘膜的功能至关重要。

本研究根据中医证候特点,采用 TNBS 诱导、疲劳、控制饮食、潮湿环境的多因素“病证结合”造模法建立脾虚湿困型 UC 大鼠模型,我们已在前期研究工作中发现,该模型符合脾虚湿困型 UC 的发病和证候特点,是可靠的实验动物模型^[4]。本研究发现脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 表达明显增强,提示 MAPK 信号通路表达被激活。参苓白术散治疗可调控脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 的表达,抑制 MAPK 信号通路的激活,从而发挥对结肠黏膜的保护作用。柳氮磺嘧啶作为磺胺类抗菌药,目前认为其对炎症性肠病产生疗效的主要成分是 5-氨基水杨酸,本研究结果发现柳氮磺嘧啶对脾虚湿困型 UC 大鼠结肠组织 ERK、p38MAPK 的表达亦有一定的抑制作用,同时参苓白术散对脾虚湿困型 UC 大鼠 ERK、P38MARK 表达的改善作用优于柳氮磺嘧啶治疗,表明采用健脾化湿法的中医辨证治疗,对脾虚湿困型 UC 的改善作用明显优于西药常规治疗。

综上所述,MAPK 信号通路与脾虚湿困型 UC 的发生有密切的关系,同时提示该通路是参苓白术散治疗脾虚湿困型 UC 的重要机制之一。由于 MAPK 信号通路较为复杂,参与了多种基因表达的调控、细胞增殖和凋亡等活动,因此,参苓白术散对该通路的调控机制仍有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wilson MS, Ramalingam TR, Rivollier A, et al. Colitis and in-testinal inflammation in IL10 mice results from IL-13 R α 2-mediated attenuation of IL-13 activity [J]. Gastroen-

- terology, 2011, 140(1):254.
- [2] Sung JJ, Kamm MA, Marteau P. Asian perspectives in management of inflammatory bowel disease: findings from a recent survey[J]. JGastroenterol Hepatol, 2010, 25(1):183-193.
- [3] 周枫, 赵海梅, 刘端勇. P38MAPK 信号: 治疗溃疡性结肠炎的又一新策略[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(3):84-86.
- [4] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与评价 [J]. 中西医结合学报, 2012, 10(8): 918-924.
- [5] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [6] 杨勇, 张巍. 炎症性肠病免疫发病机制的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2011, 16(1):181-183.
- [7] 岳宏, 王天芳, 陈剑明, 等. 溃疡性结肠炎常见中医证候及证候要素的现代文献研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5):306-308.
- [8] 陈曦, 欧阳钦, 胡仁伟, 等. 我国溃疡性结肠炎治疗性研究文献分析[J]. 四川医学, 2005(4):376-378.
- [9] 黄秋凌, 李燕舞, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠 pMEK1/2、pERK1/2 蛋白水平动态变化的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1):81-83.
- [10] 谭巨涛. 加味参苓白术散配合灌肠治疗慢性溃疡性结肠炎临床观察[J]. 山西中医, 2011, 27(5):14-15.
- [11] 杨旭东, 张杰, 王崴. 参苓白术散对脾虚小鼠肠保护作用及其机制的研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 30(5):9-11.
- [12] 张仲林, 钟玲, 臧志和, 等. 参苓白术散对动物胃肠动力影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12):3151-3152.
- [13] 李姿慧, 王键, 王又闻, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠血清 EGF、SOD、MDA 的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(5):410-413.
- [14] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎大鼠超氧化物歧化酶及丙二醛的影响 [J]. 中医杂志, 2012, 53(20):1764-1767.
- [15] 何馥倩, 邹雨珮, 黄晓丽, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在溃疡性结肠炎中的作用[J]. 四川大学学报(医学版), 2013, 44(3):393-396.
- [16] 朱向东, 段永强, 王燕, 等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 ERK1、ERK2 基因表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4):347-350.

(编辑: 李平)

Effects on Expression of ERK, p38 MAPK in Ulcerative Colitis Rats with Syndrome of Dampness Stagnancy due to Spleen Deficiency Treated with Shenlinbaizhu Powder

LI Zi-hui¹, WANG Jian¹, CAI Rong-lin², SUN Juan¹, YE Ming-gang¹

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038, China;

2. Research Institute of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effects on expression of ERK and p38MAPK in UC rats with syndrome of dampness stagnancy due to spleen deficiency that treated with Shenlinbaizhu powder. **Methods** 40 rats were divided into normal control group, model control group, Shenlinbaizhu group and sulfasalazine group, 10 in each group. The model rats were induced by environment and diet intervention combine with composite TNBS and ethanol. The expression changes of ERK and p38MAPK in rats were detected by immunohistochemistry. **Results** The expression of ERK and p38MAPK in the model group was more than in normal group ($P < 0.05$). The expression of ERK and p38MAPK in sulfasalazine group and Shenlinbaizhu group significantly decreased and shown significant difference compared with those of model group ($P < 0.05$). There was significant difference between sulfasalazine group and Shenlinbaizhu group on the expression of ERK and p38MAPK ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of ERK, p38MAPK in the UC rats with syndrome of dampness stagnancy due to spleen deficiency was increased, and Shenlinbaizhu powder could significantly improve the expression of ERK, p38MAPK in the colon tissue of UC rats.

KEY WORDS: Shenlinbaizhu powder; syndrome of dampness stagnancy due to spleen deficiency; ERK; p38 MAPK; Ulcerative Colitis